



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets 5 : C12N 15/31, C07K 3/18 C12N 5/16, C07K 15/04 C12P 21/08, G01N 33/569 A61K 39/04, 39/40		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 92/21758
			(43) Date de publication internationale: 10 décembre 1992 (10.12.92)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR92/00508		(74) Mandataire: PHELIP, Bruno; Cabinet Harlé & Phélib, 21, rue de La-Rochefoucauld, F-75009 Paris (FR).	
(22) Date de dépôt international: 5 juin 1992 (05.06.92)		(81) Etats désignés: AT (brevet européen), BE (brevet européen), CA, CH (brevet européen), DE (brevet européen), DK (brevet européen), ES (brevet européen), FR (brevet européen), GB (brevet européen), GR (brevet européen), IT (brevet européen), JP, LU (brevet européen), MC (brevet européen), NL (brevet européen), SE (brevet européen), US.	
(30) Données relatives à la priorité: 91/06970 7 juin 1991 (07.06.91) FR		Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>	
(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT PASTEUR [FR/FR]; 28, rue du Docteur-Roux, F-75724 Paris Cédex 15 (FR).			
(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement) : MARCHAL, Gilles [FR/FR]; 4, rue Francisco-Ferrer, F-94200 Ivry (FR). ROMAIN, Félix [FR/FR]; 49 bis, rue Charles-Ferdinand-Dreyfus, Bel Air, F-91640 Fontenay-les-Briis (FR). PESCHER, Pascale [FR/FR]; 158, rue Damrémont, F-75018 Paris (FR).			

(54) Title: MYCOBACTERIUM PROTEINS AND APPLICATIONS

(54) Titre: PROTEINES DE MYCOBACTERIUM ET APPLICATIONS

(57) Abstract

Mycobacterium proteins and in particular M. Bovis having a molecular weight of approximately 44.5 to 47.5 kD. Said proteins can have molecular weights of about 45 kD or about 47 kD and isoelectric pH values of about 3.7 (45 and 47 kD proteins) and 3.9 (47 kD proteins). Said proteins or hybrid proteins comprising a part of their sequences may be used as vaccines or medicaments, or for the detection and monitoring of tuberculosis, in particular in humans and in cattle.

(57) Abrégé

Protéines de Mycobactérium, et en particulier de M. Bovis présentant un poids moléculaire compris entre 44,5 et 47,5 kD environ. Ces protéines peuvent posséder des poids moléculaires d'environ 45 kD ou d'environ 47 kD et des pH isoélectriques d'environ 3,7 (protéines 45 et 47 kD) et de 3,9 (protéines de 47 kD). Ces protéines ou des protéines hybrides comprenant une partie de leurs séquences peuvent être utilisées comme vaccins ou comme médicaments, ou pour la détection et le suivi de la tuberculose en particulier chez l'homme et les bovins.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	FI	Finlande	ML	Mali
AU	Australie	FR	France	MN	Mongolie
BB	Barbade	GA	Gabon	MR	Mauritanie
BE	Belgique	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
BF	Burkina Faso	CN	Guinée	NL	Pays-Bas
BG	Bulgarie	GR	Grèce	NO	Norvège
BJ	Bénin	HU	Hongrie	PL	Pologne
BR	Brésil	IE	Irlande	RO	Roumanie
CA	Canada	IT	Italie	RU	Fédération de Russie
CF	République Centrafricaine	JP	Japon	SD	Soudan
CG	Congo	KP	République populaire démocratique de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KR	République de Corée	SN	Sénégal
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SU	Union soviétique
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	US	Etats-Unis d'Amérique
DK	Danemark	MG	Madagascar		
ES	Espagne				

Protéines de Mycobactérium et applications.

La présente invention a pour objet des protéines de Mycobactérium en particulier de *M. bovis*, ayant des poids moléculaires compris entre environ 44,5 et 47,5 kD et les séquences nucléotidiques codant pour ces protéines .

5 La présente invention a aussi pour objet des fractions protéiques obtenues à partir de cultures de Mycobactérium *bovis*, présentant une réactivité immunologique spécifique vis-à-vis d'anticorps anti-tuberculose.

10 Elle est également relative à l'utilisation de ces protéines et fractions pour la détection et le suivi de la tuberculose ainsi que comme vaccin.

15 La tuberculose continue d'être un problème de santé publique dans le monde. Le nombre des décès annuel directement en rapport avec la tuberculose est d'environ 3 millions et le nombre des nouveaux cas de tuberculose est d'environ 15 millions. Ce nombre de décès dus à la tuberculose est encore élevé pour les pays développés; par exemple pour la France, il est de l'ordre de 1500 par an, chiffre certainement sous-évalué d'un facteur 2 ou 3 si l'on considère les évaluations
20 de Roujeau sur les discordances entre les chiffres officiels et les résultats d'autopsies systématiques. La récente augmentation des cas de tuberculose, ou du moins l'arrêt de la décroissance de la fréquence de cette maladie, en corrélation avec le développement de l'épidémie de VIH/SIDA, est à prendre
25 en compte. Au total la tuberculose reste la première maladie infectieuse par sa fréquence pour la France et les pays développés, mais surtout pour les pays en voie de développement pour lesquels elle constitue la source principale de pertes humaines en rapport avec une seule
30 maladie.

Actuellement, le diagnostic de certitude apporté par la mise en évidence de bacilles cultivables dans un prélèvement provenant du malade n'est obtenu que pour moins de la moitié des cas de tuberculose. Même dans les cas de tuberculose pulmonaire qui représente 80 à 90% des atteints de tuberculose

et qui est la forme de la maladie pour laquelle la mise en évidence de bacilles est la plus facile, l'examen des expectorations n'est positif que dans moins de la moitié des cas.

5 Le développement des techniques les plus sensibles, telles que la PCR (Réaction par Polymérisation de Chaîne), se heurte toujours à la nécessité d'obtenir un prélèvement. Les femmes et les enfants ne crachant habituellement pas, les 10 prélèvements pour les formes de l'enfance nécessitent souvent une intervention médicale relativement spécialisée (biopsie ganglionnaire ou prélèvement par ponction lombaire du liquide céphalo-rachidien par exemple) .

Par ailleurs, des inhibitions de la réaction PCR elle-même existent, de sorte qu'un prélèvement peut être 15 inexploitable par cette technique du fait de l'impossibilité de contrôler leurs origines.

Enfin, le diagnostic bactériologique classique, examen microscopique et culture, par sa limite de sensibilité (au mieux de l'ordre de 10^4 à 10^5 bacilles dans le prélèvement) suppose qu'il y ait déjà eu un développement relativement 20 important des bacilles et donc de la maladie.

La mise en évidence d'anticorps spécifiques dirigés contre *Mycobacterium tuberculosis* pourrait donc apporter une aide pour le diagnostic des formes fréquentes de la maladie 25 pour lesquelles la mise en évidence des bacilles eux-mêmes est difficile ou impossible

Des générations successives de chercheurs ont tenté de mettre au point une technique de diagnostic sérologique de la tuberculose. De Ardoing (C.r. hebd. Séanc. Acad. Sci. Paris; 30 1898; 126: 1398-1401) à Middlebrook et Dubos (J. Exp. Med. 1948, 88: 521-528), les préparations utilisées pour ce diagnostic ont été très peu ou pas purifiées, l'effort portant surtout sur un accroissement de la sensibilité et non de la spécificité. Récemment encore des techniques tendant à 35 accroître seulement la sensibilité ont été proposées en

utilisant soit une technique de type ELISA soit une technique de type RIA.

Les travaux plus récents de Daniel et Janicki (Microbiol. Rev. 1978, 42: 84-113) ou Wiker et al. (Scand. J. Immunol. 5 1988, 27: 223-239), ont montré la complexité des antigènes de mycobactéries. A partir de ceux-ci, on a tenté de définir des antigènes principaux pouvant être utilisés dans un but de diagnostic (Chan et al. Am. Rev. Respir. Dis. 1990, 142: 385-390). Un test sérologique est ainsi commercialisé (ANDA) 10 depuis 3 ou 4 ans. Il utilise un antigène très complexe, mal caractérisé biochimiquement l'A60 de Cocito et Vanlinden (Clin. Exp. Immunol. 1986, 66: 262-272). La spécificité et la sensibilité de ce test sont médiocres. Il n'apporte pas une grande aide pour le diagnostic et est très critiqué voire 15 rejeté par de nombreux biologistes qui l'ont utilisé de façon large.

Des antigènes bien caractérisés, correspondant à des protéines abondantes quantitativement, ont été aussi testés pour leur spécificité et leur sensibilité pour le diagnostic 20 sérologique.

L'antigène α d'environ 35 kd a été purifié dès 1965; il représente 25 à 35 % des protéines présentes dans le milieu de culture de nombreuses souches de *M. tuberculosis*, *M. kansasii* ou BCG, (Fukui et al. Biken J. 1965, 8: 189-199).

25 Un antigène de 64 kd, représentant plus de 50% des protéines des milieux de cultures, lorsque ces dernières sont effectuées en l'absence de zinc, a aussi été purifié (De Bruyn et al. J. Gen. Microbiol. 1981, 124: 353-357).

Une seconde molécule, représentant 25 à 30% des protéines 30 dans les mêmes milieux, a également été purifiée. Cette molécule de 32 kd est très proche de l'antigène α déjà décrit, mais est néanmoins différente (De Bruyn et al. Microbiol. Pathogenesis 1987, 2 : 351-366).

De même, une molécule de 16 kd a été purifiée, et l'on a 35 constaté sa présence dans le milieu de culture de certaines

souches de BCG (NCG Tokyo) et M. bovis et son absence ou son faible niveau pour d'autres souches (BCG Copenhague, Pasteur) (Harboe et Nagai, Am. Rev. Respir. Dis. 1984, 129: 444-452).

Les critères de sélection des protéines utilisées par ces auteurs ont donc été en premier lieu des critères biochimiques. Les protéines n'ont été testées que dans un second temps pour leur capacité à détecter l'infection par la tuberculose.

Des résultats représentatifs de cette démarche montrent ainsi que la réponse en anticorps dirigés contre la protéine de choc thermique de 64 kD de mycobactéries est élevée chez 80% des malades atteints de tuberculose, mais aussi chez 30% des enfants atteints de coqueluche (Thole et al. Infect. Immun. 1987, 55 : 1466-1475).

L'utilisation des techniques de biologie moléculaire pour cloner un gène dont le produit est reconnu par un anticorps polyclonal de spécificité restreinte ou un anticorps monoclonal, a conduit sensiblement aux mêmes résultats. Dans ce cas, les anticorps qui ont été utilisés comme sondes, ont été préparés contre des antigènes présents dans des extraits de bactéries ou sur des bactéries tuées. Ces extraits ou bactéries ayant été injectés en règle générale à des souris Balb/C, le répertoire des réponses obtenues est limité à la réponse de souris de cette seule lignée, soumise de plus à des protocoles expérimentaux très semblables.

Les molécules, ayant été ainsi reconnues par certains anticorps monoclonaux, comme la 65 kD ou la 32 kD, ont déjà été purifiées ou sont en cours de purification par l'approche biochimique classique.

De nouvelles molécules comme la 70 kD ou la 19 kD, ont été aussi mises en évidence par ces techniques . Mais lorsqu'elles sont utilisées dans un but de détection, ces molécules ne permettent pas de distinguer de façon non ambiguë les sujets malades atteints de tuberculose des sujets normaux ou présentant d'autres maladies infectieuses.

Un travail récent a tenté de purifier des antigènes de mycobactéries en utilisant un mélange de sérums de malades tuberculeux pour fabriquer un immuno adsorbant permettant de purifier partiellement les antigènes principaux reconnus par 5 les malades (Thongkrajai et al. J. Med. Microbiol. 1989, 30: 101-104).

Les techniques rapportées dans l'art antérieur sont donc majoritairement basées sur l'isolement préliminaire de protéines sur leurs caractères biochimiques. Ce n'est qu'après 10 cet isolement que les auteurs testent la capacité de ces protéines à détecter les individus atteints par la tuberculose.

Dans les travaux ayant conduit à la présente invention, on a choisi une autre méthode pour sélectionner des antigènes 15 représentatifs de l'infection tuberculeuse.

Selon l'invention, on s'est attaché à sélectionner des antigènes représentatifs sans ambiguïté de l'infection tuberculeuse à l'aide de sérums provenant de malades atteints de tuberculose ou de cobayes immunisés par des bacilles 20 vivants.

Cette méthode qui se démarque des expérimentations décrites dans l'art antérieur, a permis l'isolement d'antigènes représentatifs de la tuberculose, permettant la détection sans ambiguïté des malades atteints par cette maladie.

La présente invention a donc pour objet des protéines de mycobactérium et en particulier de *M. bovis* présentant un poids moléculaire compris entre 44,5 et 47,5 kD environ. Ces protéines peuvent posséder des poids moléculaires d'environ 45 kD ou d'environ 47 kD, avec des intervalles d'erreur de +/- 30 10%, et des pH isoélectriques (pHi) d'environ 3,7 (protéines 45 et 47 kP) et de 3,9 (protéines de 47 kd), avec des intervalles d'erreur de pHI de +/- 0,2.

L'erreur de 10% dans la détermination des poids moléculaires est notamment imputable aux variations de 35 résultats en fonction des kits de détermination utilisés.

Ces protéines peuvent posséder en outre une composition en acides aminés exprimée en fréquence pour PRO d'environ 21,9% , pour ASN/ASP d'environ 10,6% , pour THR d'environ 5,4% , pour SER d'environ 5% , pour GLN/GLU d'environ 6% , pour 5 GLY d'environ 7,4% , pour ALA d'environ 19,2%, pour VAL d'environ 5,8 %, pour ILE d'environ 2,3% , pour LEU d'environ 4,7% , pour TYR d'environ 2,2% , pour PHE d'environ 2,2% , pour LYS d'environ 2,9% , et/ou pour ARG d'environ 2,5%.

L'espèce protéique de 47 kD peut avoir une extrémité 10 NH₂ terminale ayant la séquence suivante:

ALA-PRO-GLU-PRO-ALA-PRO-PRO-VAL-PRO-PRO-ALA-ALA-ALA-
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
PRO-PRO-ALA
15 16 17

15 La présente invention a d'autre part pour objet une lignée d'hybridomes déposée le 12 Avril 1991.sous le n°I.1081 auprès de la Collection Nationale de Culture des Microorganismes (CNCM) de l'Institut Pasteur , et les anticorps sécrétés par cette lignée .

20 Les protéines précédemment décrites présentent aussi la caractéristique d'être reconnues par des anticorps présents dans le sérum de patients atteints par la tuberculose ou d'animaux susceptibles d'être atteints par la tuberculose , par des anticorps obtenus par immunisation avec des bacilles 25 de M.bovis vivants , ou par un anticorps sécrété par la lignée d'hybridomes n°I.1081 précitée, et de n'être pas reconnues par des anticorps obtenus par immunisation de cobayes avec des bacilles de M.bovis tués par la chaleur ou par des anticorps de patients sains ou atteints par une maladie autre que la 30 tuberculose .

Ces protéines sont aussi caractérisées par le fait qu'elles peuvent être présentes dans le milieu de culture .

Selon un mode de mise en oeuvre particulier de l'invention , un épitope provenant d'un agent biologique autre

que *M. bovis* peut aussi être greffé sur une des protéines précédemment définies.

On obtient ainsi des protéines hybrides dont la séquence comprend la totalité ou une partie de la séquence des 5 protéines précédemment décrites et une séquence correspondant à un déterminant antigénique.

Ce déterminant peut être de diverses natures et notamment être un fragment d'antigène protéique ou glycoprotéique, en vue d'obtenir des compositions immunogènes susceptibles 10 d'induire la synthèse d'anticorps dirigés contre ces épitopes multiples .

L'utilisation d'agents de pontage bifonctionnels tels que le glutaraldéhyde ou la benzoquinone ou le N-bromo succinimide bien connus pour leurs propriétés de couplage de protéines 15 entre elles, ou tels que l'hydrazide permettant le couplage de résidus glycosylés avec des protéines , peuvent être utilisés pour la formation de molécules hybrides . Ces molécules hybrides peuvent être constituées en partie d'une molécule porteuse (complexe 45-47 kD) associée à un ou plusieurs 20 épitopes ou fragments d'antigènes par exemple la toxine diphtérique ou des fragments de celle-ci , la toxine téstanique, l'antigène HBS du virus HBV , l'antigène VP1 du virus de la poliomyélite .

Les procédés de synthèse de molécules hybrides englobent 25 les méthodes utilisées en génie génétique pour construire des ADN hybrides codant pour les séquences protéiques ou peptidiques recherchées .

De telles protéines peuvent ainsi induire l'immunisation contre des protéines ou fragments de protéines correspondant à 30 des déterminants antigéniques n'étant pas présents sur les protéines de *M. bovis*.

Un autre objet de l'invention sont les oligonucléotides, ARN ou ADN, codant pour les protéines précédemment définies.

La présente invention est en outre relative à des 35 fractions protéiques obtenues à partir de cultures de

Mycobactérium et en particulier de M.bovis par un procédé comprenant au moins les étapes suivantes :

- élimination des bactéries du milieu de culture par filtration,
- 5 - passage du filtrat sur tamis moléculaire et répartition de l'éluat en fractions , et
- sélection des fractions par détermination de leur réactivité vis-à-vis d'anticorps spécifiques et de la tuberculose.

10 Les fractions obtenues par filtration sur tamis moléculaire peuvent aussi être soumises à une chromatographie échangeuse d'ions et optionnellement à une chromatographie en phase inverse .

15 La présente invention a d'autre part pour objet l'application des protéines ou fractions protéiques ou anticorps tels que précédemment définis pour la détection et le suivi de la tuberculose en particulier chez l'homme et les bovins . Une telle détection peut notamment être mise en oeuvre par la méthode du Western Blot (immunoempreinte) ou une 20 méthode immunoenzymologique (ELISA) ou par une méthode radioimmunologique (RIA), à l'aide d'un coffret ou kit de dosage , contenant ces protéines ainsi que notamment des tampons permettant d'effectuer la réaction immunologique et en outre des substances permettant de la révéler .

25 La présente invention est en outre relative à des vaccins ou médicaments contenant au moins une protéine , une fraction protéique ou un anticorps tels que précédemment définis .

Des vaccins contenant les protéines non greffées pourront être utilisés pour immuniser des individus à l'encontre de la 30 tuberculose . Les protéines portant un épitope provenant d'un agent biologique autre que M.bovis peuvent être utilisés dans le cadre d'immunisations contre d'autres maladies .

A titre indicatif , on pourra utiliser de 50 à 500 μ g de protéine pour la dose d'un individu , ou de 10⁵ à 10⁶ 35 bactéries recombinantes / individu par voie intradermique.

La présente invention a encore pour objet une composition pharmaceutique contenant au moins une quantité pharmaceutiquement efficace d'une protéine , fraction protéique ou d'un anticorps tel que précédemment défini en 5 association avec des diluants ou des adjuvants pharmaceutiquement compatibles .

Sous un autre aspect, la présente invention est relative à l'utilisation des protéines , fractions protéines ou anticorps tels que précédemment définis pour la fabrication 10 d'un médicament pour le traitement ou la prévention de la tuberculose .

La présente invention est illustrée sans pour autant être limitée par les exemples de mise en oeuvre suivants et en référence aux dessins annexés dans lesquels :

15 La figure 1 représente le profil de densité optique (D0) à 220 et à 280 nanomètres de la filtration moléculaire (Si 300) du milieu de culture de *M.bovis*.

20 La figure 2 représente le profil en densité optique à 220 nanomètres de la séparation sur colonne échangeuse d'ions (DEAE) des molécules provenant de la fraction 2 obtenue lors de la filtration moléculaire précédente .

25 La figure 3 est le profil de densité optique à 220 nanomètres de la chromatographie sur colonne en phase inverse de la fraction 1 issue de la chromatographie échangeuse d'ions.

Les figures 4A et 4B sont des photographies des membranes de PVDF mises en présence respectivement d'un mélange de sérum de cobayes immunisés avec des bacilles morts (A) ou vivants (B) .

30 La figure 4C est un gel d'électrophorèse après coloration par du bleu de Coomassie du matériel de départ (0) et des fractions obtenues sur tamis moléculaire (1 à 6) . Des gels identiques ont été transférés sur membrane de PVDF et révélés 35 par des sérum de cobayes immunisés par des bacilles morts (4A) ou vivants (4B)

Les figures 5A et 5B représentent des membranes de PVDF correspondant à un gel obtenu par migration des fractions obtenues sur colonne échangeuse d'ions (1 à 3) et de la fraction 2 obtenue par filtration sur tamis moléculaire, 5 ladite membrane étant mise en présence d'anticorps de sérum de cobayes immunisés respectivement avec des bacilles morts (A) ou vivants (B). La figure 5C représente le gel à l'origine des transferts des figures 5A et 5B, coloré par le bleu de Coomassie.

10 Les figures 6A et 6B représentent l'empreinte des gels sur des membranes correspondant à la migration de la fraction 1 obtenue sur colonne échangeuse d'ions (0) et des fractions obtenues par chromatographie en phase inverse (1 à 5), mises en présence des anticorps des sérum de cobayes immunisés avec 15 respectivement les bacilles morts (6A) et vivants (6B). Il est à noter que dans la fraction 1 de cette étape de purification, il existe une contamination par du matériel de départ due à un chargement trop important de la colonne de chromatographie en phase inverse.

20 Les figures 7A à 7L représentent des empreintes des gels sur des membranes obtenus à partir de l'électrophorèse de matériel de départ (0), des fractions obtenues par filtration sur tamis moléculaire (1 à 6) et mises en présence de sérum individuels provenant de malades atteints de tuberculose (7A à 25 7F) correspondant respectivement au sérum des malades (N° 77, N° 115, N° 117, N° 108, N° 104, N° 105) ou par des sérum individuels provenant de malades atteints de borréliose (7G à 7K) ou de yersiniose (7L).

30 La figure 8 représente une empreinte d'un gel sur une membrane de PVDF correspondant à une électrophorèse de la fraction 5 obtenue en chromatographie en phase inverse. Cette membrane a été coupée en bandelettes de 3 mm environ et chaque

bandelette a été mise en contact d'un sérum individuel (dilué au 1/20) d'un malade atteint de tuberculose (bandes 1 à 14 correspondant respectivement aux malades N° 77 , 104, 105, 108, 115, 117 , 124, 131, 134, 123, 3a, 2g , 2d , et 2a) ou
5 de malades atteints de borréliose (bandes 15 à 19) de leptospirose (bandes 20 à 22) de yersiniose (bandes 23 et 24) ou de brucellose (bandes 25 à 27). La double marque " a" correspond à un artefact habituel dans cette technique .

La figure 9 est une photographie d'un gel en deux
10 dimensions coloré au nitrate d'argent , des protéines de 45-47
kD, (fraction 5) .

EXEMPLE 1 :

Procédé de purification des antigènes

1) Obtention des antigènes :

15 Des cultures de BCG (souche 1173 P2) sont effectuées en ballons contenant 130 ml de milieu synthétique de Sauton selon une technique classique (Gheorghiu et al. Bull. Institut Pasteur 1983, 81 : 281-288) . Le milieu de culture est récolté après 14 jours à 37°, décanté et filtré (0,22 µm) à
20 4°C . Placé sur une membrane Amicon (PM10) sous une pression d'azote de 2 bars et toujours à 4°C , le milieu de culture est lavé intensivement avec de l'eau rétro-osmosée contenant 4% de butanol , puis concentré 10 à 20 fois par rapport au volume initial . Ce milieu de culture concentré , contenant les
25 molécules non exclues par la membrane PM10 Amicon, est lyophilisé, pesé et conservé sous forme de poudre à -20°C . Les 12g du matériel de départ utilisés pour le schéma de purification décrit ci-dessous sont obtenus à partir de 30 litres de milieu de culture .

30 Schéma de purification :

2) Gel filtration:

Une colonne préparative Si300, 3 µm de 50 x 750 mm (SERVA), est équilibrée par passage d'une solution saline tamponnée (Na_2HPO_4 50 mM ajustée à pH 7,5 avec KH_2PO_4)
35 contenant 4% de butanol ; cette solution est préalablement

filtrée sur une membrane (0,22 μ m) . Le débit de la colonne est ajusté à 1,25 ml par mn; la pression maximum réglée à 45 bars n'est pas atteinte .

Le matériel à injecter sur la colonne est préparé à la 5 concentration de 50mg/ml dans la solution tampon/butanol, ultracentrifugé à 40 000 g durant 2 h puis filtré sur membrane (0,22 μ m) . Des échantillons de 10 ml sont préparés et congelés à -20°C . Chaque échantillon de 10 ml, filtré de nouveau après décongélation et injecté sur la colonne , 10 contient environ 500 mg de matériel brut . Les profils des densités optiques à 280 et 220 nm sont rapportés figure 1 pour une séquence typique de séparation . Les six fractions principales choisies d'après le profil sont concentrées à 4°C et lavées intensivement sur membrane Amicon PM10 avec de l'eau 15 rétro-osmosée contenant 4% de butanol . Chaque fraction concentrée est lyophilisée, pesée puis conservée à -20°C . La fraction 2 de cette étape contient les molécules principales reconnues par les anticorps des cobayes immunisés avec des bacilles vivants ou par les anticorps des malades tuberculeux. 20 Seule cette fraction est soumise à l'étape suivante .

3) Colonne échangeuse d'ions :

Une colonne préparative DEAE-TSK 5PW de 21,5 x 150 mm (LKB) est équilibrée avec une solution saline tamponnée (Na₂HPO₄/ NaH₂PO₄ 10 mM , pH = 7,5 et NaCl 10 mM) contenant 4% 25 de butanol . La pression maximum est inférieure à 30 bars pour un débit de 6 ml/mn. Pour le tampon d'élution , seule la concentration de NaCl est modifiée (1 M) . Un gradient linéaire est appliqué selon le schéma indiqué figure 2 après injection d'un volume d'échantillon de 4 ml contenant au total 30 100 mg du matériel précédent . Les fractions principales sont recueillies selon le profil en densité optique à 220 nm. Ces fractions sont concentrées et lavées sur membrane PM₁₀ (Amicon) par de l'eau rétro-osmosée contenant 4% de butanol, puis lyophilisées . Une fois pesée, chaque fraction est 35 conservée à -20°C . Seule la fraction 1 de cette étape

contient la majorité des molécules reconnues par les anticorps des cobayes immunisés avec des bacilles vivants ; elle est soumise à l'étape suivante de séparation .

4) Colonne phase inverse :

5 Une colonne RP 300 C₈ 10 µm de 4,6 x 250 mm (Aquapore Brownlee lab.) est équilibrée avec un tampon acétate d'ammonium ($\text{NH}_4\text{COO CH}_3$ 20 mM) filtré sur 0,22 µm avec un débit de 2 ml/mn sous une pression maximum de 115 bars . Le tampon d'élution contenant 90% d'acetonitrile est appliqué selon le
10 profil indiqué sur la figure 3 après injection d'un échantillon de 10 mg sous un volume de 1 ml. Le profil de densité optique à 220 nm permet de séparer cinq fractions principales qui sont concentrées par évaporation sous vide à 40°C , puis lyophilisées .

15 5) Immunodétection des antigènes :

Des gels dénaturants à 10 % de polyacrylamide , 0,1% de SDS sont préparés selon la technique classique de Laemmli , (Nature 1970, 227 : 680-685). Des échantillons contenant entre 10 et 2 µg de matériel , en fonction de l'étape de la
20 purification, sont appliqués dans un tampon contenant 5% de mercaptoéthanol, 3% de SDS et une trace de bleu de bromophénol sous un volume de 10 µl dans chaque piste du gel. Après électrophorèse jusqu'à la limite de migration du bleu, les molécules présentes dans les échantillons sont transférées sur
25 une feuille de PVDF (Millipore) en appliquant un champ électrique modéré durant une nuit (Harlow et Lane, Antibodies,A Laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory (eds) 1988) .

Une coloration de la feuille de PVDF par une solution de
30 bleu de Coomassie durant moins d'une minute, suivie d'une décoloration, permet le repérage des marqueurs de poids moléculaires dont les contours sont entourés d'un trait de crayon. Après décoloration totale , la feuille est lavée durant 30 mn à la température du laboratoire par du PBS +
35 Triton X100 3% , puis trois fois 5 mn avec du PBS seul . La

feuille est alors saturée avec du PBS contenant 5% de lait écrémé en poudre durant 1 h à 37°C , puis lavée avec du PBS + Tween 20 (0,2 %) trois fois .

Une incubation est effectuée avec les immunosérum dilués
5 au 1/20è dans le tampon PBS + Tween 20 (0,2%) + lait en poudre 5% durant 1 h 30 à 37°C avec des agitations périodiques. Puis trois lavages en PBS + Tween sont effectués avant l'incubation avec les anticorps anti-immunoglobulines marqués avec la phosphatase alcaline . Les anticorps anti-
10 immunoglobulines humaines et anti-immunoglobulines de cobayes , marqués à la phosphatase (Biosys) sont utilisés à la dilution finale de 1/2500 en PBS + Tween 20 (0,2%) + lait (5%) . Après 1 h 30 d'incubation à 37°C, les feuilles de PVDF sont lavées trois fois en PBS + Tween, puis incubées à la température du
15 laboratoire durant 5 à 10 mn, dans le tampon de révélation contenant BCIP et NBT (Harlow et Lane , précédemment cités). La réaction est arrêtée et après séchage des feuilles celles-ci sont photographiées.

6) Composition en acides aminés :

20 Une analyse de la composition globale en acides aminés est effectuée pour chaque fraction chromatographique dans l'unité de Chimie Organique de l'Institut Pasteur . Un analyseur Beckman LS 6300 est utilisé .

La composition globale exprimée en fréquence des acides aminés des protéines de 45-47 kD est la suivante :
25 ASN/ASP: 10,6% , THR : 5,4%; SER: 5%; GLN/GLU : 6%; GLY:7,4%; ALA : 19,2% ; VAL: 5,8%; ILE: 2,3%; LEU : 4,7%; TYR: 2,2%; PHE: 2,2% ; LYS : 2,9 % ; ARG: 2,5% ; PRO: 21,9%.

EXAMPLE 2 :

30 Détermination de la spécificité immunologique des protéines et fractions protéiques.

A. Isolement des antigènes reconnus par les anticorps des cobayes immunisés avec des bacilles vivants.

Des groupes de 12 à 15 cobayes (femelles Hartley de 250 à
35 300 g au début de l'expérience) ont reçu soit des

mycobactéries vivantes (2×10^7 unités viables de BCG en deux injections intradermiques dans 0,1 ml de solution saline) , soit 2 mg de mycobactéries de la même souche tuées par la chaleur (120°C , 30 mn) en intramusculaire dans 0,5 ml d'une émulsion solution saline dans l'adjuvant de Freund incomplet (1/1) . Les sérums de différents groupes de cobayes ont été prélevés 7 à 12 mois après l'immunisation, filtrés (0,22 µm) puis distribués en petits volumes qui sont congelés et conservés à - 20°C . Des essais de plusieurs groupes d'immunsérum ont été effectués (5 après immunisation avec des bactéries vivantes et 6 après immunisation avec des bactéries tuées) . Les résultats rapportés ont été obtenus avec un groupe de sérums représentatifs de chaque type d'immunisation; les différences entre groupes sont minimes pour le même schéma d'immunisation .

1') Etape de filtration moléculaire sur Si 300.

Le milieu de culture (lavé, concentré et lyophilisé) constituant le matériel de départ est injecté sous un volume d'échantillon de 10 ml contenant 500 mg de matériel sur la colonne Si 300. Les fractions 1 à 6 sont séparées selon le profil indiqué sur la figure 1 , regroupées pour les 24 injections successives , puis lavées , concentrées et lyophilisées . Le tableau 1 indique le poids brut de chaque fraction après lyophilisation ainsi que le poids minimum correspondant en protéines, calculé à partir des concentrations de chaque acide aminé classique déterminées par l'analyse en acides aminés de chaque fraction (analyseur Beckman LS 6300).

Chaque fraction (10 µg) est placée sur une piste d'un gel SDS ; puis , après la séquence électrophorèse, transfert sur membrane PVDF et immunodétection , les fractions contenant les protéines majoritaires réagissant avec les différents sérums sont repérées .

La figure 4 montre un gel coloré au bleu de Coomassie (Figure 4C) et deux immuno-empreintes de gels identiques

révélées avec des sérums de cobayes immunisés avec des bacilles morts (4A) ou avec des bacilles vivants (4B). Des antigènes communs sont reconnus par les deux types de sérums, tels que les antigènes de 30 kD présents dans les fractions 4, 5 et 6, et l'antigène de 38 kD dans la fraction 5. Des antigènes de poids moléculaire 10 à 16 kD dans les fractions 3, 4, 5 et 6 sont reconnus essentiellement par les anticorps des cobayes immunisés avec des bacilles morts. Deux antigènes de 45 et 47 kD présents dans la fraction 2 sont reconnus essentiellement par les anticorps des animaux immunisés avec des bacilles vivants. Cette fraction est sélectionnée pour la seconde étape de purification.

2) Etape sur colonne échangeuse d'ions :

Un échantillon de 100 mg de la fraction précédente est chargé sur une colonne DEAE-TSK préparative et éluées par un gradient de NaCl. Le profil à 220 nm des molécules éluées définit trois fractions principales (figure 2). Après regroupement, chaque fraction obtenue par les injections successives du matériel est lavée, concentrée et lyophilisée (tableau 2).

Après électrophorèse sur gel SDS de 5 µg de chacune des fractions précédentes, les immuno-empreintes sur feuille PVDF sont révélées par les sérums de cobayes immunisés avec des bacilles morts ou vivants (figures 5A et 5B). La fraction 1-DEAE ne contient que quelques antigènes reconnus par les anticorps des animaux immunisés avec des bacilles morts: deux bandes faibles à 10 et 14 kD environ, une bande faible à 52 kD et une ombre mal définie au-dessus de 67 kD. Par contre, cette même fraction 1-DEAE contient un doublet à 45/47 kD fortement reconnu par les anticorps des cobayes immunisés avec des bacilles vivants, ainsi qu'une tache intense mal limitée entre 67 et 94 kD. Cette fraction 1-DEAE est choisie pour l'étape suivante de purification.

3) Etape sur colonne phase-inverse:

Une colonne RP 300 $10\mu\text{m}$, équilibrée avec le tampon acétate d'ammonium (20 mM) , reçoit un échantillon de 1 ml contenant 5 à 10 mg maximum de la fraction 1-DEAE précédente . L'élution avec un gradient d'acétonitrile de 0 à 90% selon le 5 schéma de la figure 3 permet de récupérer cinq fractions principales . Ces fractions sont concentrées par évaporation sous vide à 40°C pour éliminer la majorité de l'acétonitrile, puis lyophilisées . Le tableau 3 indique les poids de chaque fraction.

10 La fraction 4 qui correspond à une élution entre 25 et 30% d'acétonitrile contient des antigènes de 10 à 15 kD reconnus par les anticorps présents dans le sérum des animaux immunisés avec des bacilles morts ainsi qu'un peu d'antigènes de 45/47 kD reconnus par les anticorps provenant des animaux 15 immunisés avec des bacilles vivants . La fraction 5 suivante (gradient de 30 à 50% d'acétonitrile) contient la majorité des molécules reconnues par les anticorps des animaux immunisés avec des bacilles vivants et essentiellement ces molécules (figure 6).

20 B) Essais des anticorps provenant de sujets atteints de tuberculose ou d'une autre maladie infectieuse.

25 1) Des sérums provenant de 14 malades, présentant une rechute de tuberculose pulmonaire (9 malades) ou une première atteinte (5 malades) , sont utilisés pour la caractérisation des antigènes principaux reconnus par l'homme lors d'une infection par M.tuberculosis.

N° Sexe Age

77	H	33	3ème atteinte, tuberculose étendue
104	F	47	2ème atteinte , tuberculose étendue
30	105	H 49	2ème atteinte, tuberculose moyenne
	108	H 38	2ème atteinte, tuberculose minime sur des séquelles anciennes étendues
	115	H 64	2ème atteinte
	117	H 24	2ème atteinte
35	124	H 63	2ème atteinte

N°	Sexe	Age	
131	H	64	2ème atteinte, tuberculose actuelle très étendue
134	H	33	3ème atteinte, tuberculose étendue
5	123	F 26	1ère atteinte, tuberculose moyenne
	3A	M 45	1ère atteinte, tuberculose étendue
	2G	F 17	1ère atteinte, tuberculose moyenne
	2D	M 27	1ère atteinte, tuberculose moyenne
	2A	M 52	1ère atteinte, tuberculose étendue
10		2)	Des sérum, provenant de 13 malades atteints d'une maladie infectieuse sans histoire de tuberculose récente connue, sont utilisés pour la caractérisation des antigènes sans rapport direct avec l'infection par M.tuberculosis . Les sérum ont été prélevés pour établir ou confirmer les
15			diagnostics de borréliose (5 cas), de leptospirose (3 cas) , de versiniose (2 cas) ou de brucellose (3 cas).

Ces sérum de malades atteints de tuberculose ou d'une autre infection sont négatifs pour la présence d'anticorps anti-HIV et anti-Hbs (antigène de surface du virus de l'hépatite B).

Les fractions obtenues après la première étape de séparation sur Si 300 ont été soumises à électrophorèse, puis au transfert sur membrane PVDF. Des membranes identiques ont été préparées et individuellement mises en présence d'un sérum provenant d'un sujet malade atteint de tuberculose ou d'une autre maladie infectieuse.

Les résultats obtenus pour 6 malades atteints de tuberculose et 6 malades atteints d'une autre infection montrent que des antigènes de 30 kD présents dans les fractions 4, 5 et 6 et des antigènes de 35/38 kD de la fraction 5 sont reconnus par tous les sérum . Dans la fraction 2 quelques antigènes , en particulier un antigène de 25 kD , sont aussi reconnus par tous les sérum . Par contre, seuls les sérum des malades atteints de tuberculose

interagissent fortement avec des antigènes situés dans la zone 45/47 kD (figure 7).

Ces antigènes de 45/47 kD, purifiés comme indiqué plus haut , sont placés sur une piste très large d'un gel SDS, puis 5 après électrophorèse, ils sont transférés sur une membrane PVDF qui est ensuite découpée en bandelettes de 3 mm environ . Chaque bandelette est incubée en présence d'un sérum de malades . Comme l'indique la figure 8, 12 des 14 sérums provenant de malades atteints de tuberculose reconnaissent les 10 antigènes de 45/47 kD , alors qu'aucun des sérums de malades atteints d'autres infections ne reconnaît ces antigènes .

C. Electrophorèse en deux dimensions des protéines du groupe 45-47 kD .

Une électrophorèse en deux dimensions des protéines du 15 groupe de poids moléculaire 45-47 kD a été effectuée puis le gel est coloré à l'argent (figure 9).

Les molécules sont ensuite transférées sur une feuille de PVDF puis mises en présence d'anticorps de cobayes immunisés avec des bacilles vivants ou avec des anticorps de cobayes 20 immunisés avec des bacilles morts .

Les résultats de transfert montrent que les molécules colorées à l'argent sont détectées par les anticorps des cobayes immunisés avec des bacilles vivants , tandis qu'elles 25 ne sont pas reconnues par les anticorps de cobayes immunisés avec des bacilles morts .

D'autre part , les molécules de 47 kD de ce complexe sont aussi reconnues par les anticorps monoclonaux de la lignée d'hybridomes déposée auprès de la CNCM sous le n°I. 1081.

CONCLUSION:

30 Les résultats rapportés (figure 7) montrent qu'il existe dans une préparation de mycobactéries , ici dans un milieu de culture , des antigènes reconnus à la fois par les sérums de malades tuberculeux et par les sérums de malades atteints d'autres maladies infectieuses .

Par contre des antigènes situés dans la zone 45/47 kD et présents dans la fraction 2 du fractionnement sur colonne Si300 ne sont reconnus que par des sérum de malades atteints par la tuberculose et ne sont pas reconnus par des sérum de malades atteints d'une autre infection.

Les molécules de 45/47 kD, qui ont été purifiées sur leur capacité antigénique à réagir spécifiquement avec le sérum des cobayes immunisés avec des bacilles vivants, ont des pH isoélectriques compris entre 3,7 et 3,9, ainsi qu'on l'a déterminé sur gel d'immobilines .

En gel à deux dimensions, la bande à 47 kd se résout en deux taches principales après coloration au nitrate d'argent à des pH de 3,7 et 3,9 , et la bande à 45 kD en une tache principale à pH 3,7. Des taches de moyenne intensité sont aussi visualisées par cette technique, qui font partie du complexe 45/47 kD. Les différentes molécules mises ainsi en évidence en gel à deux dimensions sont toutes reconnues par le sérum des animaux immunisés avec des bacilles vivants .

Il n'existe pas d'autres molécules décelables après coloration du gel au bleu de Coomassie ou à l'argent .

De même , après transfert sur membrane PVDF puis immunodétection avec des sérum de cobayes immunisés avec des bacilles tués par la chaleur , il n'existe aucune tache visible dans la zone des antigènes 45/47 kD , ni ailleurs .

Des sérum de lapins immunisés contre une préparation brute d'antigènes de mycobactéries ne mettent en évidence que ces molécules de 45/47 kD , montrant ainsi leur pureté sur ces critères biochimiques et immunochimiques.

Un anticorps monoclonal préparé chez la souris reconnaît les différentes molécules de 47 kd dans un essai d'immunodétection après transfert sur membrane PVDF des molécules présentes sur un gel à deux dimensions.

Aucun des réactifs immunologiques qui ont été testés (sérum de cobayes après différentes durées d'immunisation par des bactéries vivantes, sérum de malades atteints de

tuberculose) n'a pu dissocier, sur la base de la réactivité antigénique, les molécules de ce complexe 45/47 kD.

La composition globale en acides aminés des protéines de ce complexe est aussi en faveur d'une parenté étroite entre 5 elles .

TABLEAU I - Masse pondérale de chaque fraction Si 300 et évaluation du poids en protéines correspondant .

Frac-	Poids brut % en acides aminés Poids en pro-	
tion	(mg)	téines (mg)
10	Fr 1 578 15	86
	Fr 2 230 64	147
	Fr 3 580 53	308
	Fr 4 460 51	236
	Fr 5 62 67	42
15	Fr 6 370 44	161
	Total 2280 .	960

Légende du tableau I.

A partir de 12g de matériel brut , contenant au minimum 2,2 g de protéines , 6 fractions sont obtenues par filtration 20 moléculaire sur Si 300. Le calcul du poids minimum correspondant en protéines est effectué à partir des résultats de la composition globale en acides aminés .

Les rendements globaux sont de 19% pour le rendement brut pondéral et de 44% pour le rendement calculé en protéines .

TABLEAU 2- Masse pondérale de chaque fraction DEAE et évaluation du poids correspondant en protéines .

5	Frac-tion	Poids brut (mg)	% en acides aminés	Poids en protéines (mg)
	Fr 1	58,4	68	39,7
	Fr 2	8,4	32	2,7
	Fr 3	78,5	86	68,0
	Total	145,3		

10 Légende du Tableau 2:

La fraction 2 Si 300 précédente est chargée sur une colonne DEAE-TSK préparative . Une fraction non retenue par la colonne constitue la fraction 1-DEAE, les fractions 2 et 3 correspondent à l'élution par une force ionique croissante (entre 10mM et 600mM NaCl) .

15 Les rendements sont de 63% pour le rendement pondéral brut et de 75% pour le rendement calculé pour les protéines après analyse de la composition de chaque fraction en acides aminés.

20 TABLEAU 3- Masse pondérale de chaque fraction phase inverse RP 300 et évaluation du poids correspondant en protéine .

	Fraction	Poids brut (mg)	% en acides aminés	Poids en pro-teines (mg)
25	Fr1	15,0	13	2,0
	Fr 2	2,3	18	0,4
	Fr 3	1,5	13	0,2
	Fr 4	4,1	65	2,7
	Fr 5	29,9	77	23,0
30	Total	52,8		26,3

Légende du Tableau 3:

La fraction l-DEAE précédente est chargée sur une colonne RP 300 (Aquapore) , puis éluée avec un gradient d'acétonitrile de 0 à 90% selon le schéma indiqué figure 5.

REVENDICATIONS

1. Protéine de *Mycobacterium* et en particulier de *M.bovis* présentant un poids moléculaire compris entre 44,5 et 47,5 kD environ, notamment entre 45 et 47 kD environ.

5 2. Protéine selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle possède une composition en acides aminés exprimée en fréquence pour PRO d'environ 21,9%, pour ASN/ASP d'environ 10,6%, pour THR d'environ 5,4%, pour SER d'environ 5%, pour GLN/GLU d'environ 6%, pour GLY d'environ 7,4%, pour ALA 10 d'environ 19,2% , pour VAL d'environ 5,8%, pour ILE d'environ 2,3%, pour LEU d'environ 4,7% , pour TYR d'environ 2,2% , pour PHE d'environ 2,2% , pour LYS d'environ 2,9% , et/ou pour ARG d'environ 2,5%.

15 3. Protéine selon l'une quelconque des revendications 1 et 2 possédant un poids moléculaire d'environ 45 kD.

4. Protéine selon l'une quelconque des revendications 1 et 2 possédant un poids moléculaire d'environ 47 kD.

5. Protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 , présentant un pH_i d'environ 3,7.

20 6. Protéine selon l'une quelconque des revendications 1, 2 et 4 présentant un pH_i d'environ 3,9.

7. Protéine selon la revendication 4, caractérisée en ce qu'elle possède l'extrémité NH₂ terminale suivante:

ALA-PRO-GLU-PRO-ALA-PRO-PRO-VAL-PRO-PRO-ALA-ALA-ALA-

25 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

PRO-PRO-ALA

15 16 17

8. Lignée d'hybridomes déposée sous le n°I 1081 auprès de la CNCM.

30 9. Anticorps sécrété par la lignée d'hybridomes selon la revendication 8 .

10. Protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 7 , caractérisée en ce qu'elle est reconnue par des anticorps obtenus par immunisation avec des bacilles de 35 *M.bovis* vivants , par des anticorps de patients tuberculeux ou

par l'anticorps selon la revendication 9 , et n'est pas reconnue par des anticorps obtenus par immunisation avec des bacilles de M.bovis tués par la chaleur ou par des anticorps de patients sains ou atteints par une maladie autre que la tuberculose .

11. Protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 7 et 10 , caractérisée en ce qu'elle est présente dans le milieu de culture .

12. Protéine hybride dont la séquence comprend la totalité ou une partie de la séquence des protéines selon l'une des revendications 1 à 7, 10 et 11 et une séquence correspondant à un déterminant antigénique.

13.Oligonucléotides codant pour les protéines selon l'une des revendications 1 à 7 et 10 à 12.

14. Fraction protéique obtenue à partir de culture de Mycobacterium et en particulier de M. bovis par un procédé comprenant au moins les étapes suivantes :

- élimination des bactéries du milieu de culture par filtration,
- 20 - passage du filtrat sur tamis moléculaire et répartition de l'éluat en fractions,
- sélection des fractions par détermination de leur réactivité vis-à-vis d'anticorps spécifiques de la tuberculose .

15. Fraction protéique selon la revendication 14 ,caractérisée en ce que le passage sur tamis moléculaire est suivi d'une chromatographie échangeuse d'ions .

16. Fraction protéique selon la revendication 15 , caractérisée en ce que la chromatographie échangeuse d'ions est suivie d'une chromatographie en phase inverse .

17. Utilisation des protéines ou fractions protéiques ou anticorps selon l'une des revendications 1 à 7 et 9 à 16 pour la détection et le suivi de l'évolution de la tuberculose, en particulier chez l'homme et les bovins .

18. Utilisation selon la revendication 17, caractérisée en ce que le suivi et la détection sont effectuées par des méthodes enzymoimmunologiques ou radioimmunologiques ou par des immunoempreintes.

5 19. Coffret de dosage pour la mise en oeuvre de l'utilisation selon l'une des revendications 17 et 18.

20. Vaccin ou médicament contenant au moins une protéine, une fraction protéique ou un anticorps selon l'une des revendications 1 à 7 et 9 à 16 .

10 21. Composition pharmaceutique contenant une quantité efficace d'une protéine , d'une fraction protéique ou d'un anticorps selon l'une des revendications 1 à 7 et 9 à 16 en association avec des diluants ou adjuvants pharmaceutiquement acceptables.

15 22 . Utilisation des protéines ,fractions protéiques ou anticorps selon l'une des revendications 1 à 7 et 9 à 16 pour la fabrication d'un médicament pour le traitement ou la prévention de la tuberculose .

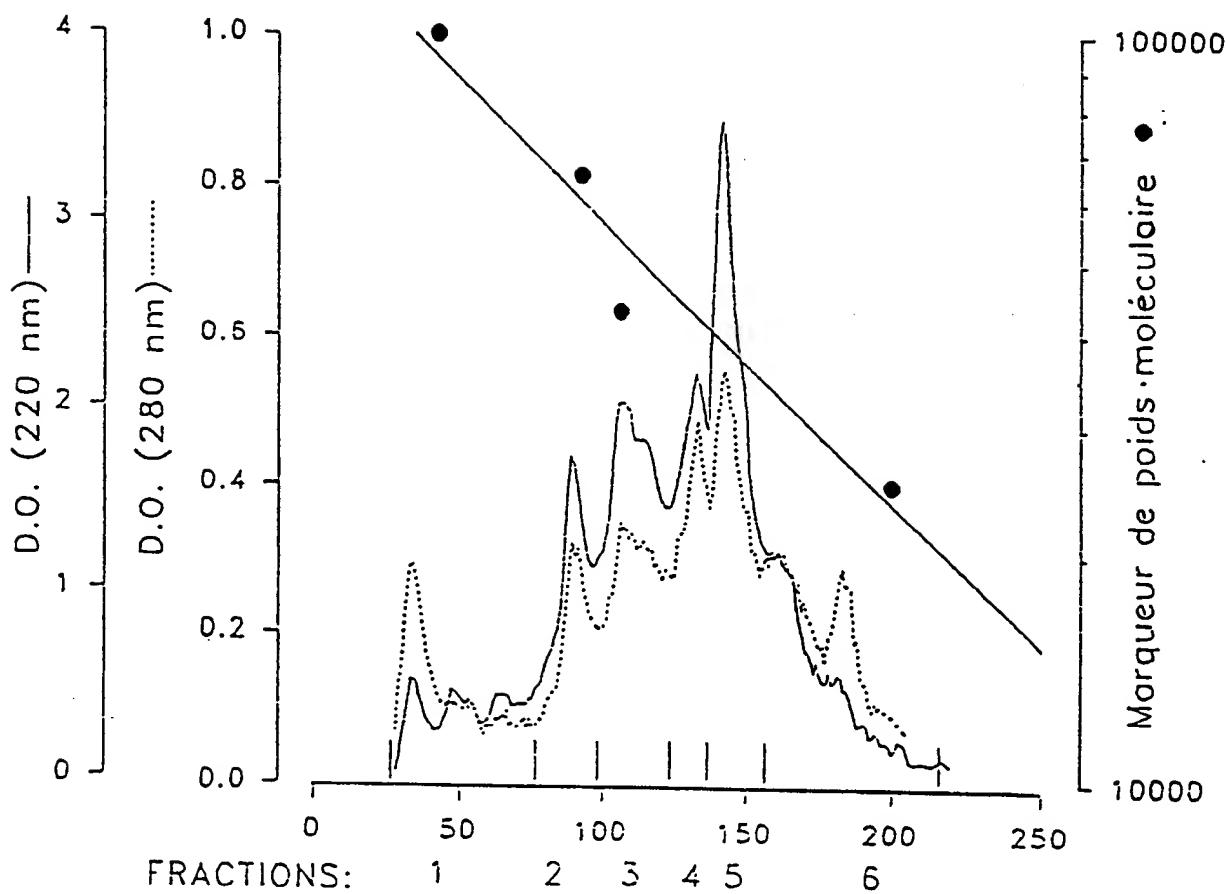


Figure 1

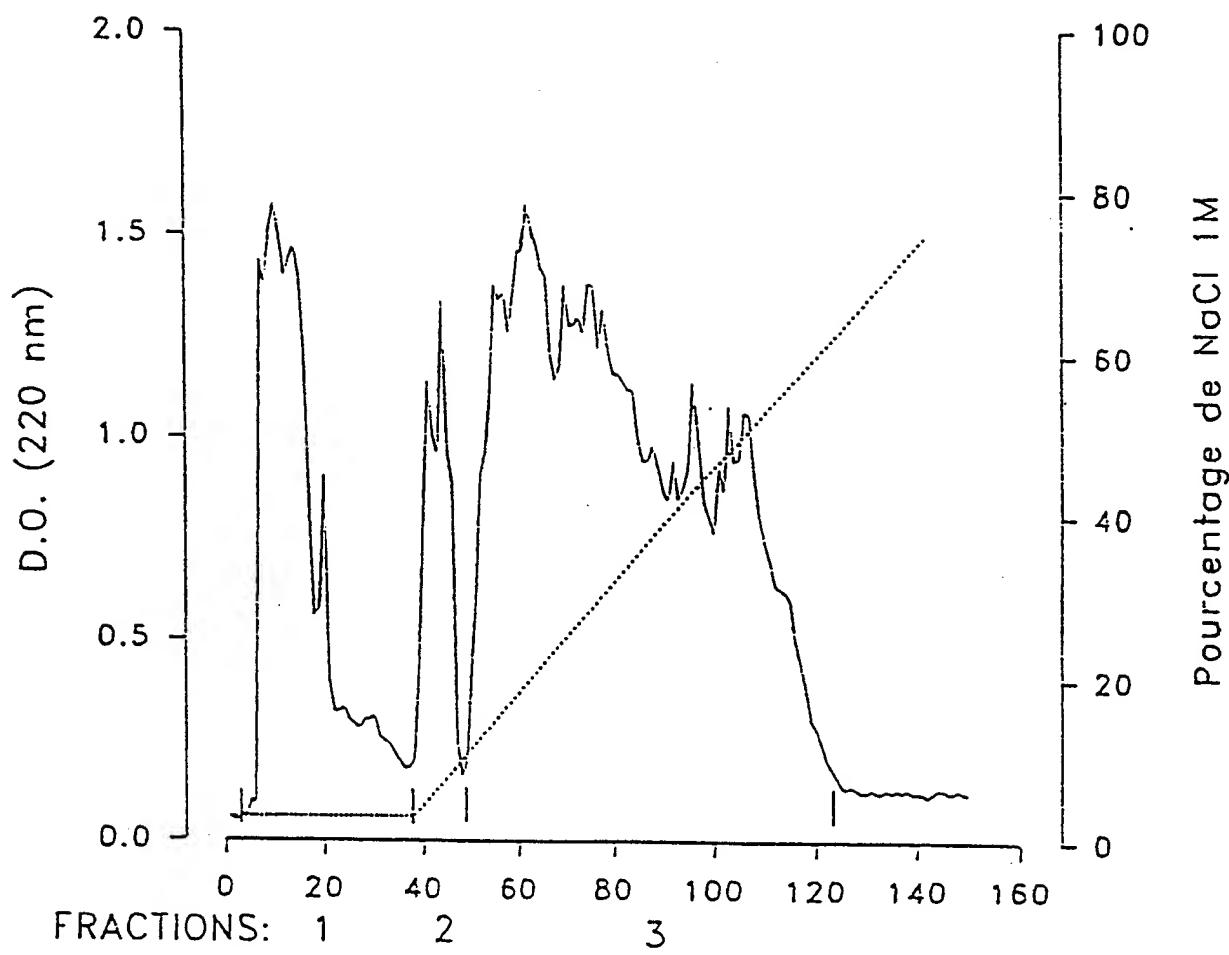


Figure 2

FEUILLE DE REMplacement

3 / 7

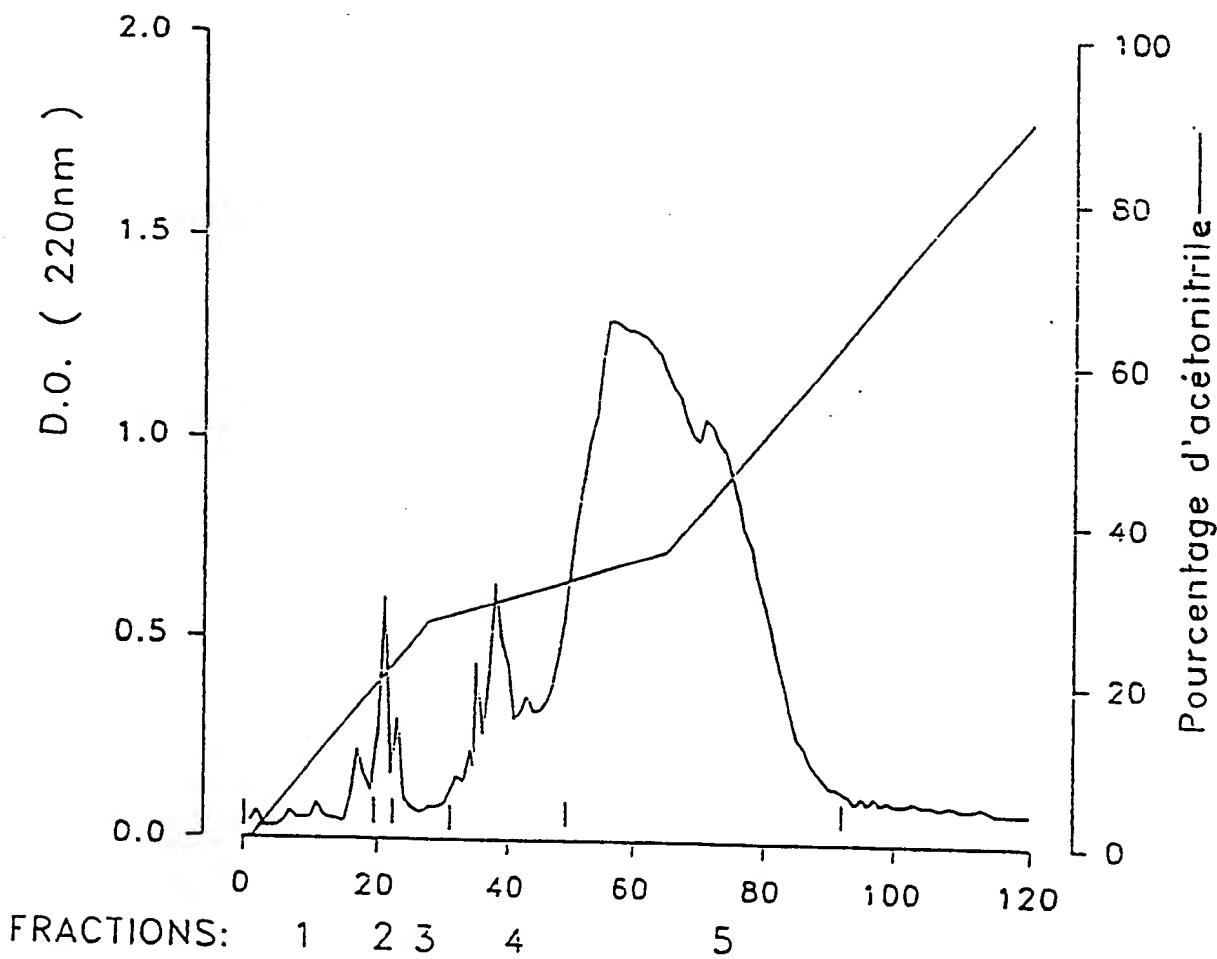


Figure 3

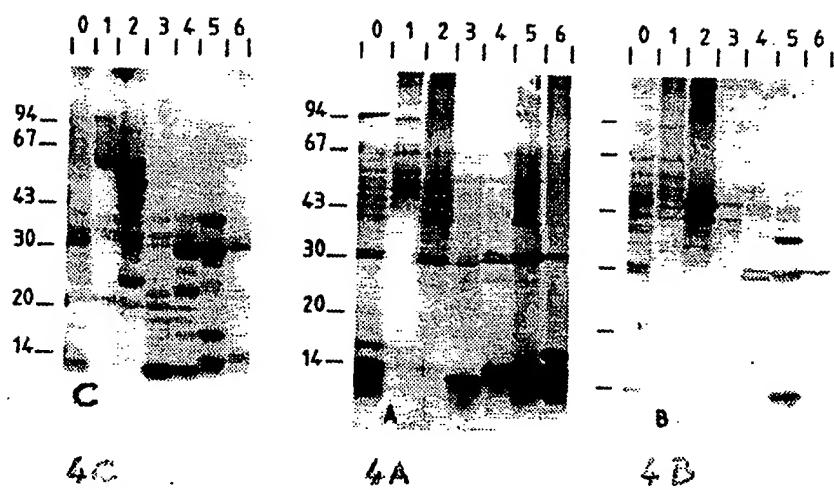


Figure 4

FEUILLE DE REMPLACEMENT

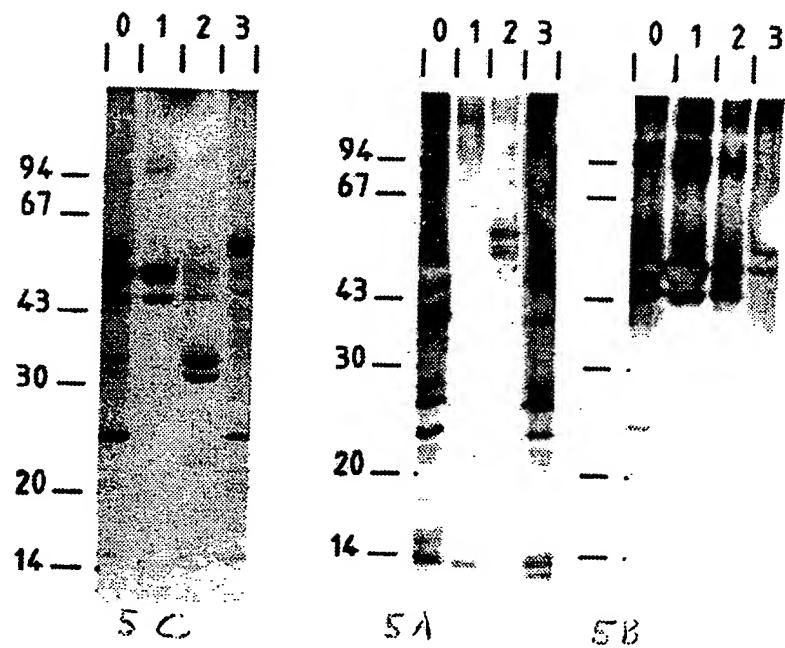


Figure 5

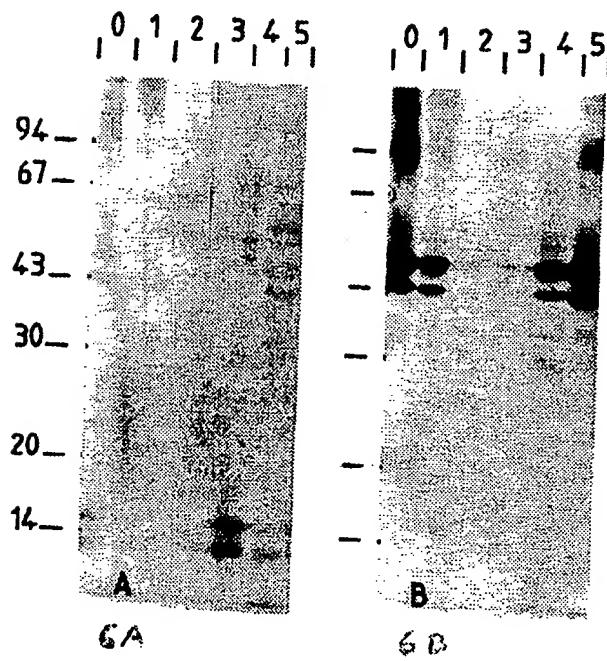
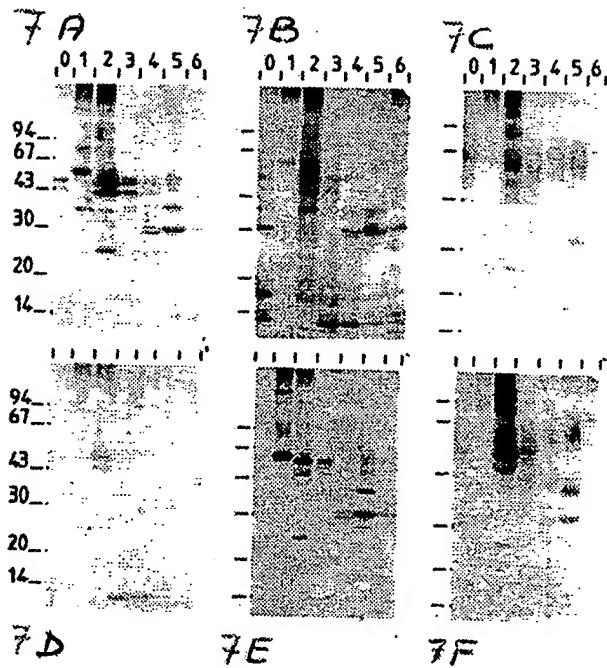


Figure 6

FEUILLE DE REMPLACEMENT



7D 7E 7F

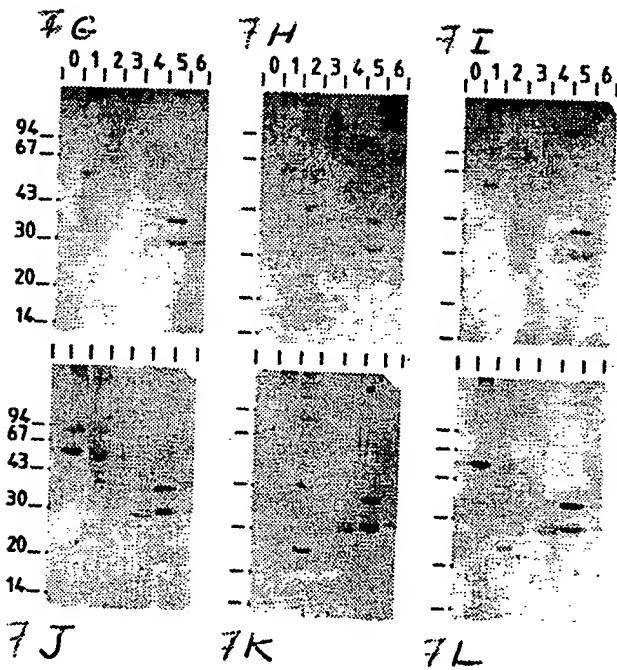


Figure 7

FEUILLE DE REMplacement

7 / 7

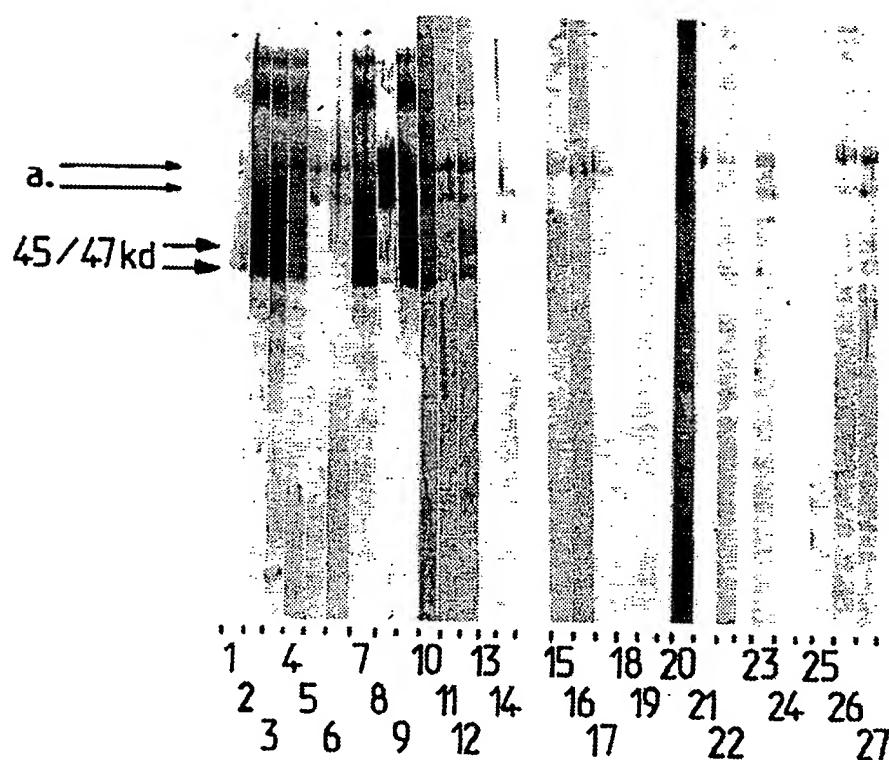


Figure 8

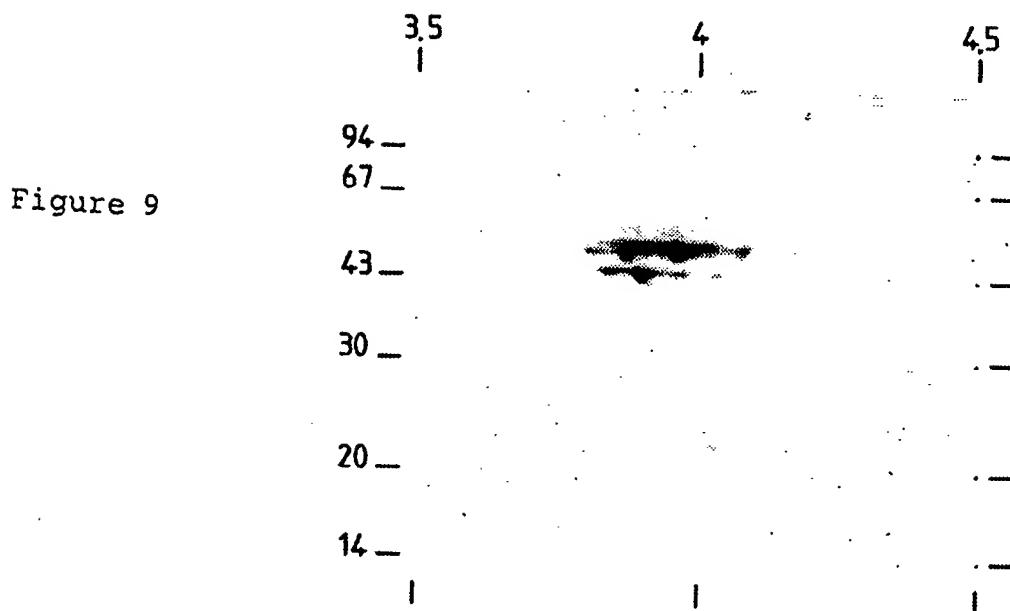


Figure 9

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

CIB 5 C12N15/31; C07K3/18; C12N5/16; C07K15/04; C12P21/08;
 G01N33/569; A61K39/04; A61K39/40

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

CIB 5 C07K; A61K; G01N; C12P C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	INFECTION AND IMMUNITY Vol. 55, NO. 12, December 1987, WASHINGTON DC, pages 3213 - 3214; C. ABOU-ZEID ET AL.: "Characterization of the secreted antigens of Mycobacterium bovis BCG: Comparison of the 46-kilodalton dimeric protein with proteins MPB64 and MPB70." see the whole document	1,3,4,10,11 14,17-19
Y	----- WO,A,8 909 261 (COMMONWEALTH SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL RESEARCH ORGANISATION) 5 October 1989 see claims	2,5-9,12,13, 15,16,20-22
Y	-----	2,5-9,12,13, 15,16,20-22

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

- Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

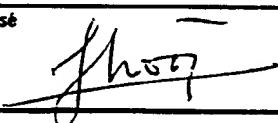
Date of the actual completion of the international search 2 04 September 1992 (04.09.92)	Date of mailing of the international search report 11 September 1992 (11.09.92)
Name and mailing address of the ISA/ EUROPEAN PATENT OFFICE Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO. FR 9200508
SA 60360**

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. 04/09/92

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO-A-8909261	05-10-89	AU-A-	3365889	16-10-89

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ⁷ Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB CIB 5 C12N15/31; C07K3/18; C12N5/16; C07K15/04 C12P21/08; G01N33/569; A61K39/04; A61K39/40											
II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée ⁸ <table border="1"> <thead> <tr> <th>Système de classification</th> <th colspan="3">Symboles de classification</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>CIB 5</td> <td>C07K ; C12N</td> <td>A61K ;</td> <td>G01N ; C12P</td> </tr> </tbody> </table>				Système de classification	Symboles de classification			CIB 5	C07K ; C12N	A61K ;	G01N ; C12P
Système de classification	Symboles de classification										
CIB 5	C07K ; C12N	A61K ;	G01N ; C12P								
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté ⁹											
III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS ¹⁰											
Catégorie ¹¹	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, ¹² des passages pertinents ¹³	No. des revendications visées ¹⁴									
X	INFECTION AND IMMUNITY vol. 55, no. 12, Décembre 1987, WASHINGTON DC, USA pages 3213 - 3214; C. ABOU-ZEID ET AL.: 'Characterization of the secreted antigens of Mycobacterium bovis BCG: Comparison of the 46-kilodalton dimeric protein with proteins MPB64 and MPB70.' voir le document en entier	1, 3, 4, 10, 11, 14, 17-19									
Y	---	2, 5-9, 12, 13, 15, 16, 20-22									
Y	WO,A,8 909 261 (COMMONWEALTH SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL RESEARCH ORGANISATION) 5 Octobre 1989 voir revendications	2, 5-9, 12, 13, 15, 16, 20-22									

¹⁰ Catégories spéciales de documents cités: ¹¹ ^{"A"} document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent ^{"E"} document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date ^{"L"} document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) ^{"O"} document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens ^{"P"} document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée											
^{"T"} document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention ^{"X"} document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive ^{"Y"} document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier. ^{"&"} document qui fait partie de la même famille de brevets											
IV. CERTIFICATION											
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 2 04 SEPTEMBRE 1992	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 11.09.92										
Administration chargée de la recherche internationale OFFICE EUROPEEN DES BREVETS	Signature du fonctionnaire autorisé NOOIJ F.J.M. 										

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.**

FR 9200508
SA 60360

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.

Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets. 04/09/92

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-8909261	05-10-89	AU-A- 3365889 EP-A- 0408625	16-10-89 23-01-91